

Лабораторные исследования для диагностики инфекционных заболеваний свиней

Малгожата Поморска-Муль

Кафедра доклинических наук и инфекционных заболеваний
Факультет ветеринарной медицины и наук о животных
Познаньский природоведческий университет
60-637 Познань, ул. Воыньска, 35, Познань

Лабораторные исследования относятся к числу методов содействия диагностике заболеваний, однако во многих случаях они фактически являются необходимым условием для правильной диагностики заболеваний (например, в случае африканской чумы свиней). Они также чрезвычайно важны для профилактики и борьбы с болезнями животных, в том числе болезнями и инфекциями свиней. Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний основывается как на оценке иммунного ответа организма, развивающегося в результате заражения (специфические антитела), так и на демонстрации наличия патогенов или их генетического материала в клиническом материале и их идентификации. Таким образом, лабораторные методы могут предоставить прямые или косвенные доказательства контакта животного с патогеном.

Независимо от используемого метода, основным условием получения надежных результатов исследования является надлежащий сбор, хранение и доставка в лабораторию соответствующего биологического материала в надлежащих условиях. Тип образцов и время, в которое они должны быть доставлены в лабораторию, каждый раз зависит от того, что мы хотим протестировать и каким методом мы будем это делать.

Кроме того, в связи с очень широким спектром методов, используемых в лабораторной диагностике, чрезвычайно важно доставить, наряду с материалами для исследования, как можно более полную информацию о животном, симптомах, текущем течении заболевания и предварительном диагнозе (анамнез).

Как уже упоминалось во введении, лабораторные исследования могут быть использованы для получения косвенных (например, наличие специфических антител) или прямых доказательств (выделение патогена или подтверждение наличия его генетического материала) контакта исследуемого животного с микроорганизмом, и на основе этого, для целей данного исследования, существующие лабораторные методы были разделены на прямые и косвенные.

Прямые методы

Бактериологические исследования используются для выделения и идентификации бактерий из материала, отправляемого на анализ. Для микробиологического исследования свиней отбираются следующие образцы: мазки из носа, миндалин и влажной слизистой, мазки из раны, абсцессные мазки, фрагменты тканей и органов и целые органы, пункции из полостей тела, а также образцы крови, фекалий и мочи. Тип образца каждый раз связан с проблемами, наблюдаемыми у животного.

Очень важно, чтобы образцы для бактериологического исследования отбирались до начала химиотерапии. Также важно выбрать подходящий участок сбора образца (место, в котором проходит процесс заболевания), время сбора образца, количество собранного материала, а также соблюдение принципов асептики для предотвращения заражения собранного материала другими патогенами, не связанными с инфекцией. Необходимо также обеспечить надлежащие условия хранения и транспортировки отобранных образцов, а также доставить их в как можно более сжатые сроки (не более 24 часов). Самое главное,

образцы должны быть охлаждены перед отправкой и предпочтительно транспортироваться в упаковке с охлаждающей жидкостью.

Методы культивирования микроорганизмов в сочетании с изоляцией и идентификацией микроорганизмов (обычно до вида) называются традиционными (классическими) методами. Помимо определения этиологического фактора, эти исследования также позволяют проводить тесты на чувствительность к химиотерапии и подбирать наиболее оптимальный терапевтический препарат.

В обычных исследованиях используются различные среды, например, для выращивания только определенных микроорганизмов или для предотвращения роста других (Рис. 1).



Рис. 1. Черные колонии *Salmonella spp.* на дифференциальной селективной среде.

После изоляции микроорганизмов можно определить их вид. Идентификация производится на основе характерного роста на средах (т.е. морфология колонии) или на основании микроскопического изображения или биохимических тестов, определяющих способность микроорганизмов расщеплять различные вещества или вырабатывать ферменты (Рис. 2).

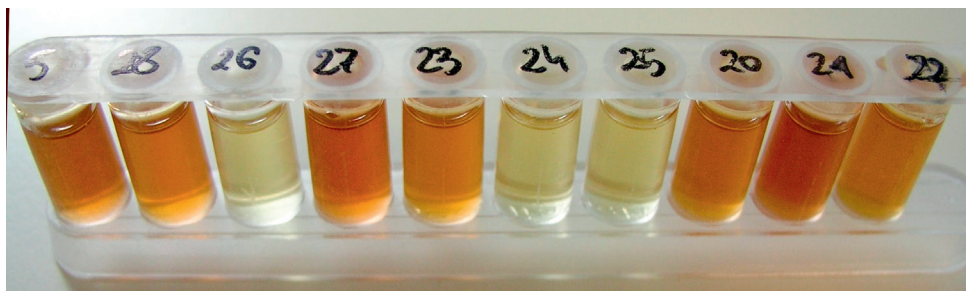


Рис. 2. Тест на способность редукции нитратов для идентификации микроорганизмов.

Каждый раз условия среды и культуры подбираются к микроорганизму, который мы хотим изолировать, поэтому, как уже было подчеркнуто в начале статьи, необходимо предоставить как можно больше информации от местного врача, заказавшего проведение лабораторного теста, о том, какой патоген или патогены его интересуют. Для персонала лаборатории необходимо правильно подготовленное сопроводительное письмо.

Посев — это длительный процесс (средняя продолжительность 2-7 дней и более), требующий обширных знаний и микробиологического опыта от диагноста. К микроорганизмам, относительно легко изолируемым из клинического материала, относятся *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli* и т.д.

Изоляция некоторых микроорганизмов, например, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* и *Mycoplasma hyopneumoniae*, из клинического материала особенно затруднена, как и последующий посев.

Бактериологические исследования используются при диагностике большинства бактериальных заболеваний свиней. Бактериологическое исследование также является важным этапом в процессе подбора средства вакцинопрофилактики, поскольку одним из условий для ее успеха является идентичность полевых и вакцинных антигенов, ответственных за инфекцию в данном свином стаде.

Вирусологические исследования основаны на изоляции и идентификации вируса в исследуемом материале. В этих исследованиях используются различные типы клеточных линий, обычно это непрерывные линии, пассаж которых часто может быть бесконечным. Такие линии инфицируются надлежащим образом подготовленным материалом, и наличие вируса может быть определено морфологическими и дегенеративными изменениями (например, цитопатическим эффектом) в результате его репликации в клетках. Цитопатический эффект может принимать различные формы, например, изменение формы, размера и типичной структуры клеток, внутриклеточные изменения (изменение цвета и типичной морфологии клеточных структур, внутриядерные и внутриплазменные включения, вакуолизация ядра и цитоплазмы), образование клеточных комплексов. Кроме того, куриные эмбрионы могут быть использованы для изоляции вирусов, как в случае с изоляцией вируса гриппа.

Изоляция вирусов в клеточных культурах или куриных эмбрионах традиционно считается «золотым стандартом» вирусологической диагностики. Однако она имеет ограниченное применение в клинической практике в связи с ее низкой доступностью и относительно длительным периодом времени от сбора материала до получения результата. Поэтому другие прямые методы (в основном методы молекулярной биологии) или серологические методы, которые могут косвенно указывать на контакт животного с вирусом, чаще всего используются в повседневной, массовой диагностике. Описание серологических методов представлено в следующей части статьи.

Изоляция «живого» микроорганизма от исследуемых образцов не всегда возможна по различным причинам, в том числе экономическим. В этом случае можно использовать другие методы прямой диагностики, позволяющие определить определенные элементы структуры патогенов, например, их генетический материал или характерные антигены. К таким методам относятся:

Метод иммунофлуоресценции – метод, с помощью которого патоген может быть обнаружен непосредственно в клиническом материале. Как и ИФА, иммунофлуоресценция является иммунохимическим методом. Для визуализации антигенов в исследуемом материале используются специфические маркированные антитела, так называемые, фторохромы. Интенсивность излучения, испускаемого фторохромами, пропорциональна содержанию данного антигена в исследуемом образце. Методы иммунофлуоресценции позволяют параллельно определять несколько антигенов в одном образце. Преимущество метода заключается в его относительно высокой чувствительности и специфичности, однако интерпретация результатов требует опыта, она субъективна и требует времени.

Гибридизация *in situ*. В данном исследовании происходит определенная комбинация маркированного зонда, дополняющая искомый фрагмент патогенной нуклеиновой кислоты. Наличие в исследуемом фрагменте определенной окраски указывает на присутствие исследуемых антигенов. Этот метод используется, в частности, при диагностике синдрома послеотъемного мультисистемного истощения свиней. В случае диагностики синдрома послеотъемного мультисистемного истощения свиней поиск вируса производится в лимфатических узлах, собранных от животных.

Иммуногистохимическое исследование. Иммуногистохимия используется для обнаружения с помощью маркированных антител антигенов, присутствующих в клетках и/или тканях. Показ места связывания антител с антигеном, находящимся в клетке или ткани, возможен только при наличии соответствующей маркировки антитела. Антитела могут быть маркированы ферментами (световые и электронные микроскопические исследования) или металлами (исследования на уровне электронного микроскопа).

Иммуногистохимические исследования требуют соответствующей подготовки клинического материала, что является длительным процессом и в то же время необходимым для нормального протекания иммуногистохимической реакции. Неправильное обращение может привести к разрушению антигенов, присутствующих в образце, и предотвратить связывание определенных антител. В результате это может привести к ложноотрицательным результатам. Несмотря на очень высокую специфичность иммуноцитохимической реакции, существует вероятность неспецифических взаимодействий между тканями и используемыми антителами. Поэтому каждая иммуногистохимическая реакция должна быть дополнена правильно спланированным набором контрольных реакций (положительный и отрицательный контроль). Этот метод используется, в частности, при диагностике синдрома послеотъемного мультисистемного истощения свиней.

В случае трех вышеупомянутых методов материалом для исследования служат ткани, собранные от животных. В зависимости от заболевания, это могут быть лимфатические узлы (при циркувирусных инфекциях) или легкие (при диагностике респираторных заболеваний). На практике, однако, эти методы обычно используются только для диагностики PCV2 инфекций.

Техника ПЦР. Методы молекулярной биологии все чаще заменяют традиционные лабораторные методы. Методы, использующие амплификацию нуклеиновых кислот, характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью и менее строгими требованиями к исследуемому биологическому материалу. Одним из все более популярных молекулярных методов является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Техника ПЦР заключается в воспроизведении конкретных фрагментов нуклеиновых кислот до тех пор, пока количество генетического материала, произведенного таким образом, можно измерить

или визуализировать, например, в виде полосы на геле. Амплификация нуклеиновых кислот позволяет раннее обнаружение генетического материала микроорганизма до того, как количество антигенов достигнет уровня обнаружения, необходимого другими методами. Эта техника позволяет получить надежный результат за короткий промежуток времени. Данная техника широко используется при диагностике заболеваний свиней. Она может быть использована для обнаружения генетического материала многих патогенов свиней в клиническом материале, в частности: вирус свиного гриппа, *PPCC*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brachyspira hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Lawsonia intracellularis* и многих других.

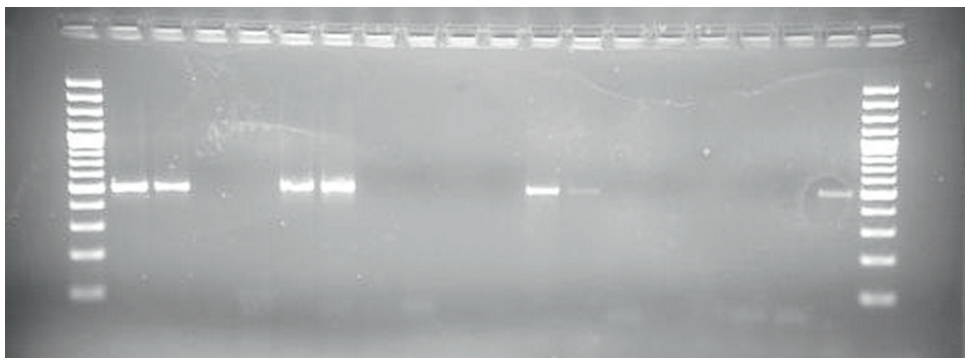


Рис. 3. Продукты реакции ПЦР (обнаружение гена *toxA*, кодирующего дермонекротоксин *P. multocida*) после электрофореза на 2% агарозном геле.

Более новая разновидность ПЦР, так называемый ПЦР в реальном времени (*Real-time PCR*), помимо качественных результатов (т.е. наличия или отсутствия генетического материала исследуемого патогена, Рис.3.), позволяет определить количество материала, которое ищется в исследуемом образце. *Real-time PCR*, используя флуоресцентные методы, позволяет контролировать количество продукта реакции в каждом цикле. Это позволяет наблюдать динамику роста дублиро-

ванного фрагмента ДНК в режиме реального времени, что еще больше сокращает время проведения анализа.

Помимо несомненных преимуществ, которые заключаются в отличных параметрах валидации и коротком времени ожидания результата, к недостаткам этих исследований относятся относительно высокая стоимость, необходимость наличия специализированного оборудования в лаборатории и соответствующих условий для проведения анализа. Все это означает, что такие исследования могут проводиться только в специализированных учреждениях.

Таким образом, общей чертой прямых методов является демонстрация патогенов или их фрагментов в исследуемом материале, что является неопровержимым доказательством их присутствия в организме животного.

Лабораторные методы, используемые для подтверждения наличия патогена или его генетического материала в исследуемом материале, описаны выше. В следующей части описываются так называемые косвенные методы, т.е. те, которые косвенно указывают на контакт животного с патогеном. На практике эти методы сводятся к различным типам серологических тестов.

В принципе, серологические тесты ограничиваются обнаружением специфических антител в исследуемом материале, которые образовались в организме животного либо в результате контакта с патогеном в окружающей среде, либо в результате введения антигена в виде вакцины.

Серологические методы особенно популярны при диагностике заболеваний животных. Они значительно дешевле прямых методов. Однако следует помнить, что серологический тест может давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Поэтому для получения достоверных результатов исследования необходимо отправлять на исследование материал, полученный от большого количества животных.

Материал для исследований

Материалом для серологических исследований обычно является сыворотка, но также может быть мышечный сок и ротовая жидкость (слюна). Исследование ротовой жидкости дает возможность относительно просто и регулярно собирать данные о состоянии здоровья стада. В настоящее время ведется активная работа по разработке новых коммерческих диагностических тестов для выявления специфических антител в ротовой жидкости для патогенов, таких как РРСС и РVС2.

Сыворотку получают из крови, собранной в пробирки без каких-либо антикоагулянтов (в сгустке). Важно не охлаждать собранную кровь в течение первых 1-2 часов после сбора, т.е. во время образования сгустка, что должно происходить при температуре окружающей среды. Слишком быстрое охлаждение крови часто приводит к гемолизу, что затрудняет получение достоверного результата. После образования сгустка, его следует отделить от стенок пробирки с помощью стерильного багета или проволоки и оставить на несколько часов в прохладном месте (например, в холодильнике). Затем отделенную сыворотку следует перелить в стерильные герметичные пробирки (например, объемом 1-2 мл типа Еррendorf). Также можно получить сыворотку быстрее, центрифугируя кровь лабораторной центрифугой при 2000 оборотов в минуту в течение 15 минут.

Используемые методы

Наиболее распространенными серологическими методами диагностики заболеваний свиней являются иммуноферментный анализ (ИФА) и тест на ингибирование гемагглютинации. Помимо этих рутинных методов, к методам, используемым для обнаружения специфических антител, относятся также метод нейтрализации сыворотки крови, иммунопероксидаза, агглютинация, реакция связывания компонента и другие.

ИФА — иммуноферментный анализ, выявляющий антитела, направленные против определенных патогенов. Благодаря своей простоте, широкому спектру доступных тестов, низкой цене и скрининговому характеру, это наиболее часто используемый серологический тест.

Анализ ИФА, как косвенный метод диагностики, выявляет только иммунный ответ организма после контакта с антигенами. Положительный результат анализа на антитела IgG позволяет предположить, что животное контактировало с микроорганизмом в прошлом, что, конечно, не указывает на наличие текущего заболевания. Антитела класса IgG на высоком уровне могут сохраняться в течение длительного времени после того, как симптомы заболевания утихнут. Выявление антител класса IgM указывает на, так называемую, свежую инфекцию, но количество коммерческих тестов, определяющих антитела класса IgM, ограничено. Исследование, так называемых, пар сывороток (сыворотки, взятые у одного и того же животного с интервалом примерно в 2 недели) и оценка сероконверсии помогают интерпретировать результаты.

Проще говоря, принцип ИФА заключается в том, что антитела в наборе, связанном с определенным ферментом (так называемым, конъюгатом), могут распознавать специфические антитела, содержащиеся в тестовой сыворотке, которая ранее была иммобилизована на среде (после связывания с антигеном, покрытым тромбоцитом). Если в сыворотке крови присутствуют специфические антитела, то добавление конъюгата формирует иммунные комплексы, которые могут быть обнаружены путем добавления подходящего субстрата. Фермент, связанный со специфическим антителом, катализирует реакцию, которая может быть определена спектрофотометрически. Приведенное выше описание метода значительно упрощено и может быть изменено на практике.

Анализы ИФА используются для диагностики репродуктивно-респираторного синдрома (РРСС), лептоспироза, микоплазменной пневмонии.

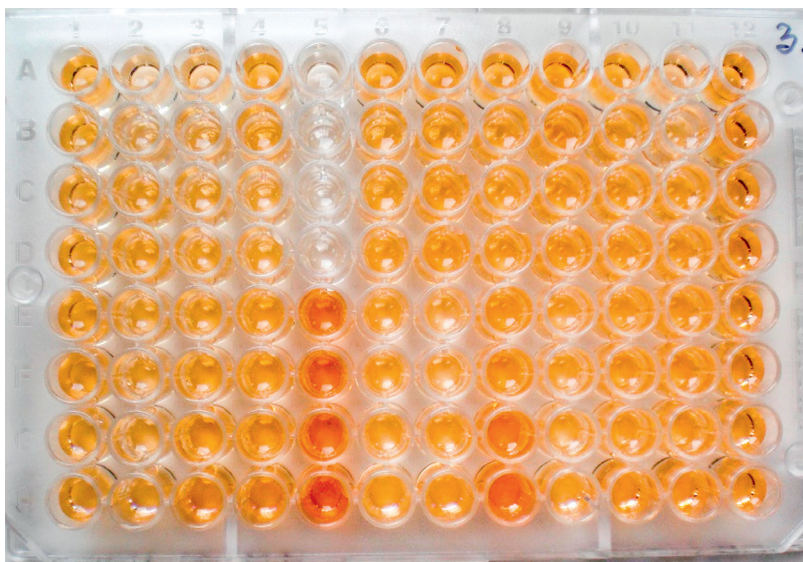


Рис. 4. Результаты ИФА анализа — обнаружение антител, направленных против некоторых сероваров лептоспир.

Тест на ингибирование гемагглютинации используется для диагностики гриппа свиней. Гемагглютинация происходит из-за действия некоторых вирусов (в том числе вирусов гриппа) на рецепторы красных кровяных телец. Ферментативная активность вирусного гемагглютинина вызывает явление слияния эритроцитов в более крупные скопления.

Тест на ингибирование гемагглютинации используется для определения ингибирующих свойств гемагглютина вируса гриппа с помощью специфических сывороточных антител. Если тестовая сыворотка содержит специфические антитела, направленные против определенного подтипа вируса гриппа (H1N1, H3N2 и H1N2), то гемагглютинационные свойства вируса блокируются, и, следовательно, клетки крови компактно располагаются на дне лунки и образуют

характерную кнопку. Однако если в тестовой сыворотке крови нет специфических для этого подтипа антител, то вирус, благодаря своей способности к агглютинации клеток крови, заставляет их оседать на дне лунки в виде характерного облака. В результате проведения этого теста мы можем определить титр антител, присутствующих в исследуемом материале, при тестировании сыворотки крови на повышенное разбавление. Титр сыворотки крови (титр HI) противоположен самому высокому разбавлению сыворотки крови, при котором гемагглютинационные свойства вируса все еще подавляются.

Проводя исследование сыворотки одного и того же животного, собранной в определенный промежуток времени, мы можем определить, свежая ли это инфекция (сероконверсия) или же животное контактировало с вирусом в прошлом (без сероконверсии). Интерпретируя результаты серологических тестов, нельзя забывать о возможности появления материнских антител, передающихся вместе с молозивом, которые в случае гриппа, особенно подтипа H1N1, могут сохраняться даже в возрасте до 15 недель.

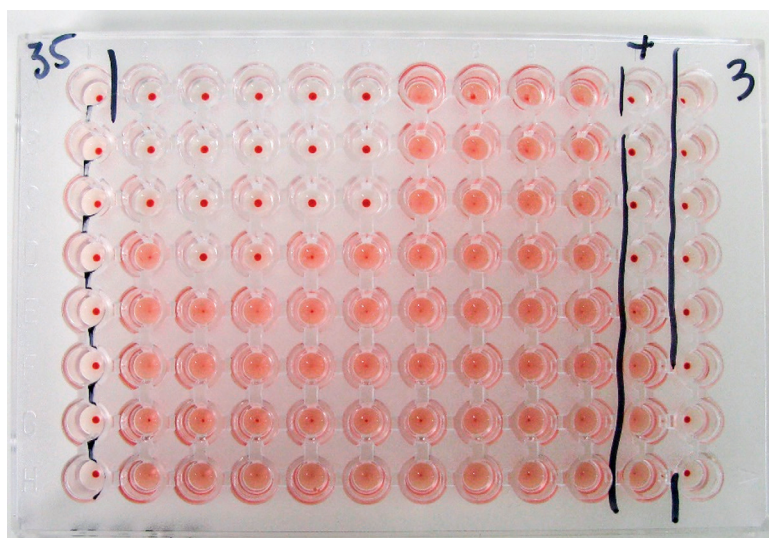


Рис. 5. Тест на ингибирование гемагглютинации — метод, используемый в диагностике гриппа.

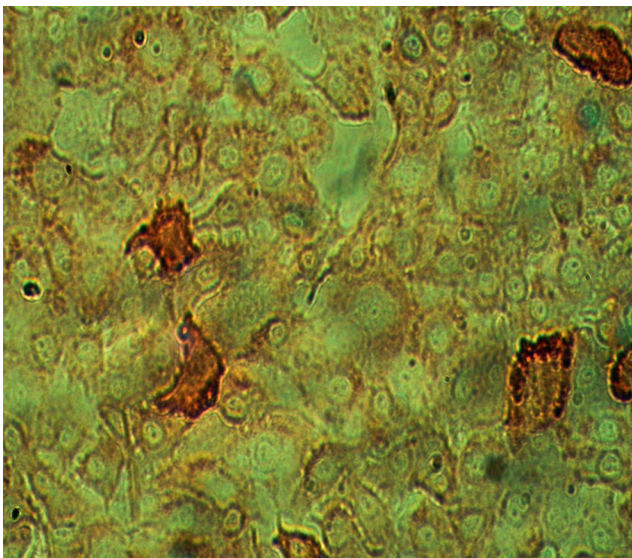


Рис. 6. Положительный результат иммунопероксидазного теста (IPMA) — подтверждение присутствия специфических антител в тестовой сыворотке крови.

Следует понимать, что время, затрачиваемое на проведение серологических тестов, очень важно для получения надежного результата. Исследования, проведенные слишком рано, в течение короткого периода времени от контакта между животным и патогеном, могут ввести в заблуждение. Для того чтобы организм вырабатывал обнаруживаемые антитела, обычно требуется от 10 до 14 дней, а иногда и больше. Кроме того, в вакцинированном стаде обнаружение антител к антигену, который был в вакцине, является нормальным явлением.

В случае получения спорных результатов рекомендуется повторно протестировать ту же самую сыворотку с использованием того же теста или, при отсутствии заключения, повторно протестировать стадо с интервалом в 2-3 недели.

Серологические тесты имеют несомненную диагностическую ценность. Как минимум два теста (пара сывороток), взятых у животных с интервалом в 2-4 недели, полезны для диагностики текущей

инфекции. Увеличение количества антител во втором тесте указывает на текущую инфекцию или развитие поствакцинального ответа (когда животное было предварительно вакцинировано). Отсутствие увеличения или снижение уровня антител не может свидетельствовать о контакте животного с данным антигеном в прошлом. Серологические методы могут также использоваться для обнаружения бессимптомных переносчиков возбудителя. Используя стратегию DIVA, т.е. специальные «маркерные» вакцины в сочетании с соответствующими ИФА анализами, можно провести различие между вакцинированными и инфицированными животными. Однако ассортимент таких продуктов все еще невелик (для свиней это вакцина против болезни Ауески).

Серологические тесты также используются для определения, так называемого, серологического профиля стада. Целью данного теста является определение уровня специфических антител в различных возрастных группах свиней. Знание профиля позволяет лучше адаптировать сроки вакцинации к ситуации в свиноматке и, тем самым, повысить эффективность вакцинации. Количество образцов, отобранных для определения серологического профиля, зависит от количества животных в свиноматке. Минимальное количество образцов не может быть менее 6 на возрастную группу (например, 4-, 8-, 12-, 16-, 20-недельные). Чем больше стадо, тем больше должно быть образцов из каждой возрастной группы.

Серологические методы также используются для мониторинга состояния здоровья стада, который должен проводиться систематически (через строго определенные интервалы времени) и во многих направлениях. Мониторинг стада позволяет осуществлять постоянный контроль и наблюдение за состоянием здоровья и позволяет быстро обнаружить момент заражения.

Таким образом, несмотря на огромный прогресс в лабораторной диагностике, достигнутый в последние годы, особенно после внедрения методов молекулярной биологии в повседневную практику, не

все ветеринары и селекционеры в Польше по-прежнему осознают важность лабораторных исследований не только для выявления, но и для профилактики заболеваний. На практике невозможно правильно диагностировать и лечить заболевание без тщательно отобранных и надежно выполненных лабораторных анализов.

Прямые методы должны использоваться при диагностике РРСС, инфекций РСВ2, гриппа, большинства бактериальных заболеваний, а серологические — при диагностике болезни Ауески, гриппа, микоплазменной пневмонии и РРСС. Серологические тесты вирусологического обследования стада для выявления вируса РРСС, болезнь Ауески и микоплазменной пневмонии характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью (>98%). Однако они имеют ограниченное применение при диагностике заболеваний, вызываемых *PCV2*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, парвовируса свиней, *E.coli*.

Не следует забывать, что медицинские и ветеринарные знания необходимы не только для поручения проведения соответствующих тестов и сбора соответствующего материала, но и для надлежащего анализа результатов лабораторных исследований. Следует помнить, что в отношении микроорганизмов, встречающихся повсеместно, использование результатов серологических тестов нецелесообразно из-за отсутствия корреляции между наличием антител и началом заболевания.

Наконец, следует добавить, что ошибочно рассматривать отрицательный результат как информацию, не имеющую большого значения. Напротив, отрицательный результат может привести к изменению ветеринарного поведения в данном хозяйстве, что приведет к экономии средств, связанных с охраной здоровья свиней.

Литература доступна у автора: malgorzata.pomorska@piwet.pulawy.pl